

形態および機能の異なる2種のGH産生腺腫の遺伝子発現プロファイルの解析

徳島大学歯学部歯科薬理学 吉本勝彦

徳島大学医学部人体病理学 佐野壽昭

虎の門病院脳神経外科 山田正三

杏林大学医学部第二生化学 脇坂晟

はじめに

成長ホルモン(GH)産生腺腫は正常のGH産生細胞と同じ形態の細胞(densely granulated type, D型)と分泌顆粒が少なく、細胞質内にサイトケラチンの集束を認める細胞(sparsely granulated type, S型)に分けられる。S型はD型に比して、大型の腫瘍が多く、発見時年齢も若年傾向を示す。さらにS型は、成長ホルモン放出ホルモン、プロモクリプチン、ソマトスタチン負荷に対するGH反応が低下している。2細胞腫間の遺伝子発現を比較検討することにより、形態的および機能的な表現型の差異の基盤となる因子を明らかにする必要がある。

研究方法

1. 32例のGH産生腺腫および採血が可能であった28例の血液を用いて検討した。得られた腫瘍および血液よりゲノムDNAを抽出した。

A. GH産生腺腫における接着因子の発現

38例のD型GH産生腺腫と24例のS型GH産生腺腫の接着因子の発現を免疫組織化学的に検討した。D型およびS型の判定は低分子量サイトケラチン(CAM5.2)の免疫組織化学により判定した。E-カドヘリン、P-カドヘリン、N-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、 γ -カテニン および pp120 の発現を免疫組織学的に検討した。

B. β -カテニン遺伝子の体細胞変異の解析

ホルマリン固定パラフィン包埋標本から抽出したゲノム DNA を鋳型として、 β -カテニン遺伝子エクソン3 部分を PCR にて増幅した。PCR 産物を pCR4.0 TOPO TA cloning vector に組み込み、塩基配列を決定した。

C. E-カドヘリンプロモーター領域のメチル化の解析

腫瘍から抽出したゲノム DNA を CpGenome DNA modification kit (Intergen) で処理した。処理済みゲノム DNA を鋳型にして、メチル化を認識するプライマー対および非メチル化を認識するプライマー対を用いて PCR を行った。

2. DNA マクロアレイ解析

D 型、S 型それぞれの腫瘍より抽出した poly(A) RNA を用いて、放射性標識した cDNA プローブを作成した。DNA マクロアレーはクロンテック社の BD Atlas cDNA Expression Human 1.2 Arrays を使用した。ハイブリダイゼーション後、BAS2000 イメージングスキャナーで解析した。測定結果の評価には Fujifilm Array Gauge Ver 1.2 を使用した。

結果

1. GH 産生腺腫における接着因子の発現

10 例の正常下垂体前葉においては、E-カドヘリンはほとんど全てのホルモン産生細胞の細胞膜上に発現していた。24 例の S 型腺腫における E-カドヘリンの発現は正常下垂体前葉あるいは D 型腺腫に比して有意に減少していた。他のホルモン産生腺腫においては正常下垂体前葉と同程度の発現が認められた。S 型腺腫における N-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、 γ -カテニン および pp120 の発現も、正常下垂体前葉、D 型腺腫および他のホルモン産生腺腫よりも減少していた。P-カドヘリンの発現は認められなかった。

2. β -カテニン遺伝子の体細胞変異の解析

細胞質における β -カテニン遺伝子の集積を除外できないため、 β -カテニン遺伝子の体細胞変異の解析を行った。しかし、16例のS型腺腫および10例のD型腺腫においては変異は認められなかった。

3. E-カドヘリンプロモーター領域のメチル化の解析

16例のS型腺腫および10例のD型腺腫においてメチル化の有無を検討した。S型腺腫の16例中6例においてプロモーター部位の高メチル化を認めた。10例のD型腺腫においてはメチル化は認められなかった。

4. DNA マクロアレイ解析

腺腫より抽出した poly(A) RNA から、放射性標識した cDNA を作成し、ヒトの 1,176 個の遺伝子が結合した Expression Array を用いて遺伝子の発現度を解析した。両タイプの腺腫間で発現に一定の差異の見られた遺伝子について、Atlas Human Arrays の分類に従い、それぞれの遺伝子群における遺伝子の発現頻度を表 1 に示す。D 型より S 型腺腫で発現の高い遺伝子が出現するのは、細胞接着および細胞表面抗原、DNA 複製・修復・組換え、およびシグナル伝達に関与する遺伝子群である (表 1)。これらのグループでは S 型に比して D 型腺腫でより高い発現度を示す遺伝子は見られなかった。

考察

GH 産生腺腫は 2 つの組織形態像に分類できる。すなわち、分泌顆粒に富んだ腫瘍細胞からなる D 型腺腫と、分泌顆粒の乏しい細胞からなる S 型腺腫である。D 型の腫瘍細胞は正常の GH 産生細胞と同様に好酸性で、分泌顆粒に富んだ細胞質をもつ。サイトケラチ

ンが核の周囲を取り囲むように分布する。これに対し、S型の腫瘍細胞は嫌色素性で、細胞質内にサイトケラチンの明瞭なドット状の陽性像 (fibrous body) が観察される。S型のものはD型に比べ、若年者に多く、腫瘍が大きく、より浸潤性である。

本研究においては、E-カドヘリンおよび、その裏打ち蛋白である α -カテニン、 β -カテニン、 γ -カテニン および pp120 の発現が、S型腺腫において減少していることを見いだした¹⁾。すなわち、E-カドヘリン・カテニン系の down regulation が S 型腺腫の形態と関連していることが示唆された。S 型腺腫に認められる fibrous body はサイトケラチン中間径フィラメントが分泌顆粒、ミトコンドリア、リソゾームなどと混じり合って形成された球形の構造物で核周囲に存在する。また S 型腺腫は散在した形で存在することが多いことから、腫瘍細胞間の接着能が低下している可能性が示唆された。E-カドヘリンおよびカテニンの発現低下がアクチン・マイクロフィラメントの変化を惹起し、最終的にサイトケラチン中間径フィラメントの異常集積により fibrous body が形成されと考えられる。S 型腺腫における E-カドヘリン発現の低下は Nishioka らによっても確認されている²⁾。

E-カドヘリンの発現低下の機序として一部の腺腫はプロモーターのメチル化で説明できるが、残りの7割についてはその機構は不明である。最近、E-カドヘリンの転写を抑制する因子として snail、SIP1 が明らかにされた。snail あるいは SIP1 の発現状態の解析が今後必要である。

クロンテック社の Atlas 1.2 Array 上の約 1,200 個の遺伝子について、S 型腺腫と D 型腺腫との間に、それぞれの遺伝子の発現レベルに一定の差が認められた遺伝子は 50 個 (4.25 %) 存在した。このうち表 1 に示されるように細胞接着・細胞表面抗原、シグナル伝達、および DNA 複製・修復・組換えに関連する遺伝子群ではその発現増大が S 型腺腫でのみ見られた。特に細胞接着に関連する遺伝子群においては、その 10 % 強の遺伝子の発現レベルが D 型腺腫に比し S 型腺腫で高いことが注目された。しかし、免疫組織化学の結果と反して、DNA アレイの結果においては、E-カドヘリン遺伝子は D 型腺腫に比し S 型腺腫で

はむしろ発現が約4倍に増大していた。免疫組織化学は蛋白レベルを、DNA アレイは mRNA レベルを反映するため、この差異の原因については不明である。同一検体を用いた遺伝子発現および蛋白発現の解析が必要と考えられる。一方、本アレイ上に存在する α 1-カテニンと β 1-カテニンの2つの遺伝子のS型/D型比は各0.51と0.12で、一定の差はないものの、S型腺腫で発現が低い傾向を有した。

このように、S型腺腫では細胞接着におけるレセプター因子（カドヘリン、デスモグレイン、インテグリン）の遺伝子発現が一般的に大きいのに対し、リンカーあるいはアダプター因子と呼ばれるカテニンやプラコグロビンの発現が低い傾向にあり、両者間の接着に関して何らかの不具合が生じていることが推測される。その結果、細胞接着因子と細胞質内ケラチン線維ネットワークとの結合が十分に形成されず、細胞内に fibrous body が生じる可能性がある。

以上の結果より、細胞接着系の異常がS型腺腫の一つの特徴であり、それが臨床的悪性度と関係している可能性が示唆される。

文献

1. Xu B, Sano T, Yoshimoto K, & Yamada S: Downregulation of E-cadherin and its undercoat proteins in pituitary growth hormone cell adenomas with prominent fibrous bodies. *Endocr Pathol*, 13:341-351, 2002.
2. Nishioka H, Haraoka J, Akada K. Fibrous bodies are associated with lower GH production and decreased expression of E-cadherin in GH-producing pituitary adenomas. *Clin Endocrinol*, 59:768-772, 2003.

表 1. DNA マクロアレイ解析による S 型腺腫と D 型腺腫の遺伝子発現の差異.

遺伝子の機能分類	n*	発現レベル	
		S > D	S < D
Cell adhesion molecules			
& surface antigens	42	5 (11.9%)	0
Cell signaling	113	9 (8.0 %)	0
Replication, repair,			
& recombination	57	5 (8.8%)	0
Apoptosis	77	2 (2.6 %)	0
Growth factors			
& their receptors	84	2 (2.4%)	0
Transcription factors			
& their effectors	126	4 (3.2 %)	5 (4.0 %)
Adaptors, transducers,			
& their inhibitors	40	2 (5.0 %)	3 (7.5 %)
Oncogenes	95	4 (4.2 %)	2 (2.1 %)
Cell cycle regulation	37	2 (5.4 %)	1 (2.7 %)
Residuals	522	3 (0.6 %)	1 (0.2%)
Total	1176	38 (3.2 %)	12 (1.0%)

*Atlas array メンブレン上の遺伝子数